



**Susana Cecília Frederico da Cunha Vieira**

Licenciada em Análises Clínicas e Saúde Pública

## **Abordagem Biomédica no Rastreio do Cancro Colorretal**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Genética Molecular e Biomedicina

Orientador: Margarida Castro Caldas, Professora Auxiliar,  
Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de  
Lisboa



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Setembro de 2018**

## **Abordagem Biomédica no Rastreio do Cancro Colorretal**

“Copyright” Susana Cecília Frederico da Cunha Vieira, FCT/UN e UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



## Agradecimentos

Foi longo o caminho percorrido ao longo da elaboração desta tese. Sinto que não poderia deixar de agradecer a todos aqueles que contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

Primeiramente gostaria de deixar uma palavra de apreço à minha orientadora Margarida Castro Caldas, Professora Auxiliar na Faculdade de Ciências da Universidade Nova de Lisboa, pelo seu apoio durante este percurso, mesmo que à distância, na orientação deste Relatório de atividade Profissional.

À Dra. Isabel Carvalho, Médica Patologista do Serviço de Patologia Clínica do Hospital Garcia de Orta, pela partilha do saber e valioso contributo na elaboração desta tese.

À instituição onde trabalho, o Hospital Garcia de Orta, por toda a colaboração prestada, assim como aos meus colegas Técnicos Superiores e todos os outros profissionais do Serviço de Patologia Clínica.

Por fim, um agradecimento especial à minha família, a quem foram retiradas muitas horas da minha presença, e que me apoiaram incondicionalmente.

Às minhas filhas Madalena e Violeta, eterna fonte de inspiração, tão jovens e já tão sábias.

Ao meu marido e companheiro pela sua eterna compreensão e paciência.

Aos meus pais, os alicerces da minha vida.

*“O que sabemos é uma gota de água, o que ignoramos é um oceano.”*

**Isaac Newton**



## RESUMO

As doenças oncológicas estão entre as principais causas de morte em todo o mundo. O cancro colorretal é a terceira causa de morte por cancro nos países desenvolvidos. Em Portugal, o cancro é a segunda causa de morte em Portugal, sendo o colorretal responsável por 15% dos óbitos por cancro.

É possível alcançar uma significativa diminuição da incidência e mortalidade por cancro, adotando ações de promoção da saúde e prevenção da doença, tais como a implementação de programas de rastreio

O Plano Nacional de Prevenção e Controlo das Doenças Oncológicas preconiza o rastreio do Cancro Colorretal nos indivíduos assintomáticos com idades entre os 50 e os 74 anos. O exame recomendado é a pesquisa de sangue de sangue oculto nas fezes, através de ensaio imunoquímico quantitativo. Este é um exame não invasivo, de fácil amostragem com taxas de sensibilidade e especificidade altas, contribuindo assim para a redução da mortalidade e morbilidade devido à doença.

O presente documento tem como objetivo abordar a temática do rastreio do Cancro Colorretal e as ferramentas que a ciência disponibiliza para a sua realização, nomeadamente a pesquisa de sangue oculto nas fezes.

O Relatório foi redigido segundo as Normas apresentadas pelo Conselho Científico da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, para elaboração do Relatório de Atividade Profissional para a obtenção do Grau de Mestre em Genética Molecular e Biomedicina.

É apresentado um relato da atividade profissional, descrevendo as atividades desenvolvidas e responsabilidades adquiridas, por forma a demonstrar as competências alcançadas por via da formação académica, formação complementar e experiência profissional. Segue-se uma apresentação no âmbito do tema Cancro Colorretal e sua carcinogénese e do Rastreio do Cancro Colorretal. Neste trabalho é exposto o ensaio pesquisa de sangue oculto nas fezes com descrição dos seus métodos, e comparação entre a metodologia utilizada no Serviço de Patologia Clínica antes e depois do início do protocolo assinado com o Hospital Garcia de Orta para a realização do programa de rastreio nacional do cancro colorretal.

## PALAVRAS-CHAVE:

Técnica Superior de Diagnóstico e Terapêutica, Cancro Colorretal, Rastreio do Cancro Colorretal, Pesquisa de Sangue Oculto nas Fezes.



## **ABSTRACT**

Oncological diseases are among the leading causes of death worldwide. Colorectal cancer is the third leading cause of cancer death in developed countries. In Portugal, cancer is the second cause of death in Portugal, with colorectal cancer accounting for 15% of deaths.

A significant reduction in cancer incidence and mortality can be achieved by adopting health promotion and disease prevention actions, such as the implementation of screening programs.

The National Plan for the Prevention and Control of Oncological Diseases recommends the screening of Colorectal Cancer in asymptomatic individuals aged between 50 and 74 years. The recommended examination is the screening of fecal occult blood through a quantitative immunochemical assay. This is a non-invasive, easily sampled test with high sensitivity and specificity rates, thus contributing to the reduction of mortality and morbidity due to the disease.

This document aims to address the issue of colorectal cancer screening and the tools that science makes available for it, including the fecal occult blood test.

The Report was written according to the Norms presented by the Scientific Council of the Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, to prepare the Report of Professional Activity to obtain the Master's Degree in Molecular Genetics and Biomedicine.

An account of the professional activity is presented, describing the activities developed and responsibilities acquired, in order to demonstrate the competences achieved through academic training, complementary training and professional experience. Following is a presentation on the topic of Colorectal Cancer and its carcinogenesis and Colorectal Cancer Screening. In this study, the fecal occult blood test is explained with description of its methods and a comparison between the methodologies used in the Clinical Pathology Laboratory before and after the beginning of the protocol signed with the Hospital Garcia de Orta for the accomplishment of the screening program of colorectal cancer.

## **KEY WORDS:**

Technician of Diagnosis and Therapeutics, Colorectal Cancer, Colorectal Cancer Screening, Fecal Occult Blood Test.





## ÍNDICE GERAL

CAPÍTULO I - Breve contextualização profissional.....	1
I.1 - Formação académica.....	1
I.2 - Formação Profissional e Complementar.....	1
I.3 - Experiência Profissional.....	2
I.4 - Enquadramento profissional.....	3
I.5 – Contextualização.....	3
I.6 - Aspetos Gerais do SPCHGO	
1.6.1 – Fase Pré-analítica.....	4
1.6.2 – Controlo de Qualidade.....	4
I.7 - O Laboratório de Bioquímica e Endocrinologia.....	5
 CAPÍTULO II - O cancro colorretal.....	7
 CAPÍTULO III - O Rastreio do Cancro Colorretal.....	13
 CAPÍTULO IV - A Pesquisa de Sangue Oculto nas Fezes.....	17
IV.1 - Teste de Haemocult/Guaiaac based.....	17
IV.2 - Teste Imunoquímico (FIT- Fecal Immunochemical Test).....	18
 CAPÍTULO V - Metodologia utilizada no Laboratório de Bioquímica do SPCHGO.....	21
V.1 - Chemtrue® One-Step FOB Test.....	21
V.2 – Equipamento HM-JACK arc.....	23
 CAPÍTULO V - Apresentação de resultados.....	29
 CAPÍTULO VII - Discussão e conclusão.....	31
 BIBLIOGRAFIA.....	33



## ÍNDICE DE FIGURAS

FIG. II.1 – A Tumorigénese Colorretal.....	9
FIG.III.1 – Evolução das taxas de cobertura geográfica e de adesão do rastreio do cancro da mama em Portugal (2009-2016) .....	14
FIG.III.2 – Evolução das taxas de cobertura geográfica e de adesão do rastreio do cancro do colo do útero em Portugal (2009-2016) .....	15
FIG.III.3 – Evolução das taxas de cobertura geográfica e de adesão do rastreio do cancro do cólon e reto em Portugal (2009-2016) .....	15
FIG. IV.2.1 – Formação do imunocomplexo antígeno-anticorpo conjugado com o ouro coloidal.....	18
FIG. IV.2.2 – Componentes do Teste Imunoquímico .....	19
FIG. IV.2.3 – Interpretação dos resultados do Teste Imunoquímico/Imunocromatográfico .....	19
FIG. V.1.1 – Apresentação comercial do teste Chemtrue® One-Step FOB Test .....	21
FIG. V.1.2 – Interpretação visual dos resultados do teste Chemtrue® One-Step FOB Test fornecido no kit do reagente .....	22
FIG. V.2.1 – Componentes do Equipamento HM-JACK arc .....	23
FIG. V.2.2 – Imagem do tubo coletor HemoAuto MC.....	24
FIG. V.2.3 – Precisão da colheita do tubo coletor HemoAuto MC .....	24
FIG. V.2.4 – O tubo coletor HemoAuto MC e a respetiva rack de amostras.....	25
FIG. V.2.5 – Partícula de latex sensibilizada com anticorpos anti hemoglobina humana.....	25
FIG. V.2.6 – Princípio de deteção por nefelometria de esfera de integração.....	26



## ÍNDICE DE TABELAS

TAB. II.1 – Principais oncogenes e genes supressores de tumor envolvidos na carcinogénese colorretal.....	10
TAB II.2 – Classificação dos tumores malignos do cólon e reto.....	11
TAB. III.1 – Objetivos específicos do Programa de Rastreio do CCR implementado pela ARSLVT, IP.....	16



## ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRAF. V.1 – Prevalência de casos positivos nos testes PSOF realizados pelo SPCHGO no âmbito do programa de RCCR.....	29
--	----





## LISTA DE SIGLAS E ACRÓNIMOS

ISHT – Instituto Superior de Humanidades e Tecnologias

ESSEM – Escola Superior de Saúde Egas Moniz

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

HCV – Vírus da Hepatite C

HBV – Vírus da Hepatite B

HGO – Hospital Garcia de Orta, E.P.E.

HMP – Hospital Militar Principal

SPA – Serviço de Patologia Clínica

SPCHGO – Serviço de Patologia Clínica do Hospital Garcia de Orta, E.P.E.

SA - Sociedade Anónima de Capitais Exclusivamente Públicos

EPE - Entidade Pública Empresarial

CHKS - Caspe Healthcare Knowledge System

TSDT - Técnicos Superiores de Diagnóstico e Terapêutica

TDT - Técnicos de Diagnóstico e Terapêutica

TACSP - Técnico de Análises Clínicas e Saúde Pública

DL - Decreto-Lei

CQI – Controlo de Qualidade Interno

AEQ - Avaliação Externa da Qualidade

MPA – Módulo Pré-analítico

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CCR - Cancro Colo-Rectal

APC - *Adenomatous Polyposis Coli*

KRAS - *Kiersten rat sarcoma viral oncogene homolog*

BRAF - *V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*

PIK3CA - *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase*

FBXW7 - *F-box/WD repeat-containing protein 7*

SMAD4 - *SMAD family member 4*

TCF7L2 - *Transcription factor 7-like 2*

CTNNB1 - *Catenin beta 1*

N-RAS - *Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog*

SOX9 - *Transcription factor SOX9*

PAF - Polipose Adenomatosa Familiar

PJ - Polipose Juvenil

HNPCC - Cancro Colorretal Hereditário não Associado à Polipose

OMS - Organização Mundial de Saúde

ACES - Agrupamentos de Centros de Saúde

ARSLVT, IP - Administração Regional de Saúde de Lisboa e Vale do Tejo, I.P

PSOF - Pesquisa de Sangue Oculto nas Fezes

TDF - Teste de DNA Fecal

mRNA - RNA mensageiro



## **CAPÍTULO I**

### **Breve contextualização profissional**

#### **I.1 - Formação académica**

A formação académica de base foi adquirida em 1999 no Instituto Superior de Humanidades e Tecnologias – ISHT sita em Lisboa, através da frequência do bacharelato em Biotecnologia.

Seguiu-se a frequência da licenciatura em Análises Clínicas e Saúde Pública na Escola Superior de Saúde Egas Moniz – ESSEM sita em Monte da Caparica. Esta licenciatura era constituída por um regime bietápico, o primeiro dos quais o bacharelato foi concluído em 2003, e o seguinte, a licenciatura foi concluída em 2004.

#### **I.2 - Formação Profissional e Complementar**

Como profissional da área de Diagnóstico e Terapêutica procurou sempre aprofundar e atualizar seus conhecimentos técnicos e científicos através da frequência de vários cursos e ações de formação:

11/2004 – Formação sobre o equipamento LH – Izasa com duração total de duas horas;

12/2004 – Formação sobre o equipamento Modular SWA – Roche com duração total de três horas;

01/2005 – Formação sobre o equipamento STA-RACK – Roche com duração total de duas horas;

02/2005 – Formação sobre o equipamento Elecsys 2010 Disk – Roche com duração total de duas horas;

04/2007 - Sessão Prática de sistemas COBAS Integra 800 com duração total de sete horas;

03/2011 – Curso de Formação sobre o sistema m2000 Abbott RealTime de extração, amplificação de ácidos nucleicos e deteção de HBV, HIV, HCV e Genotipagem de HCV com duração total de trinta e duas horas;

11/2011 – Curso de Formação em Electroforese Capilar ThermoFisher – Phadia com duração total de sete horas;

02/2012 – XLII Curso de Autoimunidade Laboratorial ThermoFisher com duração total de cinco horas;

02/2012 – Curso de atualização sobre o sistema m2000 Abbott RealTime de extração, amplificação de ácidos nucleicos e deteção de HIV e HCV, com duração total de oito horas;

05/2013 – Curso de atualização Architect Ci8200, V8.1 – Premium com duração total de duas horas;

10/2013 – Curso Básico de Usuário do Sistema PhD com duração total de três horas;

05/2014 – Formação sobre o equipamento Modular PPEE com duração total de duas horas;

09/2014 – Formação da plataforma Cobas Infinity com duração total de quatro horas;

03/2015 – Ação de apresentação da Solução Global Bio-Rad para Controlo de Qualidade Laboratorial com duração total de duas horas;

01/2016 – Ação de apresentação do equipamento SPA Plus com formação de utilizadores com duração total de seis horas;

11/2017 – Curso de Comunicação e Assertividade com duração total de doze horas.

### **I.3 - Experiência Profissional**

Como Técnica de Diagnóstico e Terapêutica, iniciou a sua vida profissional nesta área em 2003, como flebotomista no Instituto de Cardiologia de Almada onde fazia recolha de fluídos e produtos biológicos. Nesse mesmo ano ingressou no Serviço de Patologia Clínica (SPC) do HMP - Hospital Militar Principal em Lisboa nos laboratórios de Bacteriologia e de Urgência, adquirindo a responsabilidade da validação técnica durante os turnos noturnos das valências de Hematologia, Hemóstase e Bioquímica Laboratorial.

Em 2004 ingressou no Serviço de Patologia Clínica do Hospital Garcia de Orta, E.P.E. - SPAHGO em Almada onde desempenha funções como técnica de 2ª classe desde então.

Entre 2004 e 2011 desempenhou funções no Laboratório de Urgência, atuando como técnica indiferenciada nas diferentes áreas do bloco de urgência, nomeadamente, Hematologia, Hemóstase, Bioquímica Laboratorial e Imunologia com competência para validação técnica dos resultados.

Em 2011 inicia funções no Laboratório de Imunodiagnóstico e Biologia Molecular deste mesmo Hospital. Neste serviço esteve integrada nas diversas áreas de imunodiagnóstico, tais como, autoimunidade e serologia bacteriana e viral, com aplicação de técnicas de biologia molecular, nomeadamente na deteção de cargas virais de HIV, HBV e HCV e genotipagem de HCV. Neste laboratório acumula funções de execução das análises e interpretação de resultados, manutenção dos diferentes equipamentos, realização dos controlos de qualidade internos e externos e gestão do stock de consumíveis e reagentes. Desde essa data que realiza colheitas de sangue periférico e outros produtos biológicos aos doentes das consultas externas que acorrem ao serviço de colheitas do SPCHGO.

Desde 2014 e até à presente data, desempenha funções no Laboratório de Bioquímica e Endocrinologia no SPCHGO. Neste serviço tem estado integrada nas diferentes áreas da Bioquímica Clínica e Endocrinologia, que incluem a determinação de vários metabolitos tais como marcadores cardíacos, marcadores tumorais, doseamento de fármacos e drogas de abuso, doseamentos endocrinológicos e alergologia. Neste laboratório acumula funções de execução das análises e interpretação de resultados, manutenção dos diferentes equipamentos, realização dos controlos de qualidade internos e externos e gestão do stock de consumíveis e reagentes.

Em 2018 integrou o júri do Concurso Público nº 1900018 para a Aquisição de Reagentes para o Laboratório de Bioquímica e Laboratório de Urgência do Serviço de Patologia Clínica do HGO, EPE, com colocação de Equipamentos, como 4ª vogal.

No âmbito da formação e docência, tem sido responsável pela formação/integração de colegas neste laboratório, assim como orientadora externa de alguns alunos que realizaram estágio na área de Bioquímica Clínica para a conclusão da licenciatura em Análises Clínicas e Saúde Pública.

#### **I.4 - Enquadramento profissional**

Em 28 de Julho de 2017 foi promulgado o Decreto-Lei (DL) nº 110/2017 que define o regime legal da carreira dos técnicos superiores de diagnóstico e terapêutica, desde então designados como TSDT, integrados no Serviço Nacional de Saúde (SNS). No ponto 3 do Artigo 3º deste DL, pode-se ler que “integram a carreira de TSDT os trabalhadores cujas funções correspondem a profissões de saúde que envolvam o exercício de atividades relacionadas com as ciências biomédicas laboratoriais, da imagem médica e da radioterapia, da fisiologia clínica e dos bio sinais, da terapia e reabilitação, da visão, da audição, da saúde oral, da farmácia, da ortoprotesia e da saúde pública.”

A extinta designação de técnico de análises clínicas e saúde pública (TACSP), inseria-se na carreira dos técnicos de diagnóstico e terapêutica (TDT), que era definido pelo DL 564/99 promulgado a 30 de Novembro de 1999, que definia no Artigo 5º, ponto 1 a), as funções de um TACSP como “o desenvolvimento de atividades da patologia clínica, imunologia, hematologia clínica, genética e saúde pública, através do estudo, aplicação e avaliação das técnicas e métodos analíticos próprios, com fins de diagnóstico e de rastreio.”

#### **I.5 - Contextualização**

O Hospital Garcia de Orta, E.P.E. sita em Almada, iniciou a sua atividade em Setembro de 1991. Em 2003 foi classificado como Hospital Central, deixando de pertencer ao Sector Público Administrativo e passando para o Sector Empresarial do Estado, primeiramente como Sociedade Anónima de Capitais Exclusivamente Públicos (SA), e mais tarde, em 2006 como Entidade Pública Empresarial (EPE). O HGO serve atualmente uma população estimada de 350 mil habitantes dos concelhos de Almada e Seixal, sendo que a sua zona de influência em algumas especialidades estende-se para lá da Península de Setúbal, nomeadamente Neonatologia, Neurocirurgia e Infertilidade. (<http://www.hgo.pt>. Acesso em Setembro 2018)

Desde 2011 que é acreditado pelo Caspe Healthcare Knowledge System (CHKS), um dos organismos internacionais de maior prestígio na área de Qualidade em Saúde, sendo que ainda este ano, renovou pela terceira vez a sua acreditação.

O Serviço de Patologia Clínica do H.G.O. em que trabalha está certificado segundo a Norma ISO 9001:2008 – Sistemas de Gestão da Qualidade. O seu espaço físico é composto por 2 secretariados,

5 salas de colheitas e cinco laboratórios, nomeadamente Imunologia, Hematologia e Hemóstase, Bioquímica e Endocrinologia, Microbiologia e Urgência. A equipa de trabalho é multidisciplinar, sendo composta por médicos, técnicos superiores de diagnóstico e terapêutica (TSDT), assistentes administrativos e assistentes operacionais.

Como laboratório hospitalar, funciona em contexto de urgência 24 horas por dia, 365 dias ao ano, e os restantes laboratórios, em contexto de rotina, todos os dias úteis das 8h00 às 16h00. O SPCHGO realiza uma média de 2 milhões e 600 mil análises anuais, em que cerca de 1 milhão e 500 mil são realizadas em contexto de rotina.

## **I.6 - Aspetos Gerais do SPCHGO**

### **I.6.1 – Fase Pré-analítica**

A fase pré-analítica ocorre desde o pedido do clínico até à análise. A colheita, o armazenamento e o transporte representam uma fase crítica na análise das amostras, sendo a mais propícia à ocorrência de erros. Até o mais sofisticado equipamento analítico pode fornecer resultados inválidos se a integridade da amostra estiver comprometida.

A colheita das amostras deve ser realizada seguindo rigorosamente todos os procedimentos, de modo a garantir a obtenção de um resultado válido. Todas as amostras devem ser corretamente identificadas com uma vinheta que dispõe o nome do utente, o número de laboratório e o respetivo código de barras (que está otimizado para ser lido pelos vários equipamentos do SPCHGO). As amostras cuja colheita não for da responsabilidade do SPCHGO (ex.: serviços de internamento, serviços de urgência, etc.), devem-se encontrar dentro dos critérios de aceitação do SPCHGO.

Antes da colheita de qualquer tipo de amostra, deve-se confirmar sempre a correta identificação do utente, no que diz respeito ao nome completo. No caso de colheita de sangue periférico, deve-se estabelecer com o utente um diálogo tranquilizador, tentando confirmar outro tipo de informações relevantes como o jejum ou a medicação efetuada. Devem ser fornecidas ao utente as informações necessárias para que ele se sinta preparado para os exames a efetuar. O técnico superior de análises clínicas verifica as análises prescritas e identifica os tubos. Durante a colheita de sangue periférico, deve tentar sempre respeitar os volumes indicados de modo a conseguir uma correta proporção entre sangue e anticoagulante (EDTA e Citrato de Sódio). No caso de tubo seco (sem anticoagulante) não é necessário respeitar este volume. Após a colheita, deve-se homogeneizar os tubos através de movimentos de inversão suaves. As amostras colhidas na central de colheitas do SPCHGO são de imediato enviadas e encaminhadas para os diferentes laboratórios.

### **I.6.2 – Controlo de Qualidade**

O controlo de qualidade assegura a fiabilidade dos resultados analíticos. A garantia da qualidade num laboratório permite dominar e organizar de modo eficaz todas as etapas, abrangendo



obrigatoriamente as fases pré-analítica, analítica e pós-analítica, incluindo procedimentos como o controlo de qualidade interno e a avaliação externa da qualidade.

O controlo de qualidade interno (CQI) pode definir-se como um conjunto de procedimentos, quer sejam na fase pré-analítica, analítica ou pós-analítica, que se destinam a assegurar a qualidade dos resultados analíticos. Na fase analítica, o CQI é efetuado diariamente antes de se iniciar o processamento das amostras, geralmente através da utilização de mais do que um nível de controlo. O CQI é sempre efetuado em casos de novo kit/lote de reagente, em cada nova calibração, após manutenção específica ou em caso de alguma tendência dos resultados. Os dados de CQI são registados e analisados, através de critérios de validação estabelecidos pelo SPCHGO, segundo as regras de Westgard e Levey-Jennings.

A avaliação externa da qualidade (AEQ) corresponde à avaliação por um organismo exterior da qualidade dos resultados fornecidos por um laboratório. A AEQ permite a melhoria dos níveis de desempenho dos ensaios realizados no laboratório e a comparabilidade de resultados com outros laboratórios, dando uniformidade e credibilidade ao trabalho desenvolvido. O SPCHGO está inscrito em programas de controlo de qualidade externo como o RIQAS (Randox International Quality Assessment Schemes), INSA (Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge) e NEQAS (United Kingdom External Quality Assessment Schemes).

### **I.7 - O Laboratório de Bioquímica e Endocrinologia**

O Laboratório de Bioquímica e Endocrinologia onde desempenha funções desde 2014 está, como o nome indica, dividido em duas grandes áreas: Bioquímica e Endocrinologia. Os produtos analisados neste laboratório são provenientes dos doentes das consultas externas, dos internamentos e dos centros de saúde associados ao hospital.

A área de Bioquímica está inserida no “CoreLab” sendo constituída pelos seguintes equipamentos:

Módulo Pré-analítico MPA – sistema automático destinado ao processamento pré-analítico de amostras. Este equipamento faz a centrifugação e separação em alíquotas de vários tipos de amostra, tais como:

Tubo seco – separação em soro para doseamentos de Bioquímica, Endocrinologia e Imunologia.

Urina 24horas - doseamentos de Bioquímica e Endocrinologia.

Urina Ocasional – doseamentos de Bioquímica

Tubo EDTA gel – separação em plasma para doseamentos de Biologia Molecular.

Modular EVO – auto analisador constituído por 2 módulos de elétrodos seletivos, 2 módulos P800 (análises fotométricas) e 2 módulos E170 (análises por imunoensaio). Este equipamento está ligado online ao Módulo MPA, e efetua as técnicas de bioquímica, Imunoquímica, Endocrinologia, marcadores específicos e Ionograma.

Cobas 6000 – auto analisador constituído por um módulo de bioquímica e 1 de imunologia. Está alocado ao laboratório de urgência efetuando análises do laboratório de bioquímica, nomeadamente fármacos e marcadores cardíacos.

Gem 4000 e Cobas 123 – equipamentos para a medição de pH e gases, eletrólitos, lactato e co-oximetria.

Osmómetro 030 – Osmómetro de congelação. Efetua o doseamento da osmolalidade sérica e urinária.

Aution Max AX Urinalysis System e Sedimax – Cadeia para exame de urina II e respetivo sedimento urinário.

A área de Endocrinologia é constituída pelos seguintes equipamentos:

Immulite 2000 xpi – auto analisador de quimioluminescência. Efetua o doseamento de algumas hormonas e testes de alergologia.

Adams A1C HA-8180T – Doseamento de Hemoglobina Glicada através de HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência)

SPA Plus – Equipamento de imunoturbidimetria para doseamento de cadeias leves livres kappa e lambda.

Wisard – Contador gama para a realização de radioimunoensaaios.

Analisador HM-JACKarc – Equipamento de nefelometria de esfera de integração para deteção quantitativa de hemoglobina humana em amostras fecais.

## CAPÍTULO II

### O Cancro Colorretal

O cancro é definido como uma proliferação anormal de células. Resulta da acumulação de alterações genéticas e epigenéticas numa célula somática. As células deixam de responder a sinais ambientais que regulam o seu normal crescimento, deixam de respeitar as barreiras físicas normais e limites temporais do seu desenvolvimento normal, e adquirem uma vantagem de crescimento sobre as suas células vizinhas.<sup>1</sup>

As doenças oncológicas estão entre as principais causas de morte em todo o mundo. Segundo o relatório da Globocan 2012, o cancro colorretal é a terceira causa de morte por cancro nos países desenvolvidos, com uma estimativa de 700.000 mortes anuais.<sup>2</sup> As maiores taxas de incidência situam-se na Europa Ocidental e Oceânia, sendo que África e região Centro-Sul da Ásia apresentam as menores.<sup>3,4</sup>

A etiologia do cancro colorretal (CCR) é multifatorial, resultando de fatores ambientais e genéticos, sendo que a maioria dos CCR são esporádicos e não familiares.<sup>5</sup> Existe a evidência de alguns fatores de risco associados à incidência de CCR, e que estão relacionados com o estilo de vida, tais como o consumo excessivo de álcool, o tabagismo, uma reduzida atividade física, o consumo de carnes vermelhas e uma dieta pobre em fibras e vegetais.<sup>6</sup> A idade é considerado um fator de risco para a ocorrência do CCR esporádico. A incidência de CCR cresce significativamente em indivíduos na faixa etária dos 40 as 50 anos.<sup>4</sup>

Geralmente, este tipo de neoplasia não apresenta sintomas no início, dificultando por isso o diagnóstico. Devido a um longo processo carcinogénico, a duração do período assintomático do CCR está estimado em pelo menos 10 anos.<sup>2</sup> Os sintomas mais comuns desta doença são: alteração dos hábitos intestinais, sangue nas fezes, desconforto abdominal, sensação de enfartamento, perda ponderal, astenia, náuseas e vómitos.<sup>7</sup>

A maioria dos cancros colorretais desenvolvem-se a partir de adenomas, sendo que a maioria são pólipos que progrediram de pequenos (<8mm) para grandes (>8mm), seguindo-se a displasia e o cancro. Os pólipos podem-se apresentar como adenomatosos ou hiperplásicos, necessitando de uma biópsia para os diagnosticar. Geralmente, os pólipos hiperplásicos não evoluem para cancro. Estes geralmente são tipicamente pequenos (< 8mm) e distais.<sup>7</sup>

O adenoma e o carcinoma podem surgir geralmente a partir de uma instabilidade genómica, com a introdução de várias mutações genéticas e/ou epigenéticas que são determinantes na evolução do tumor benigno para maligno.

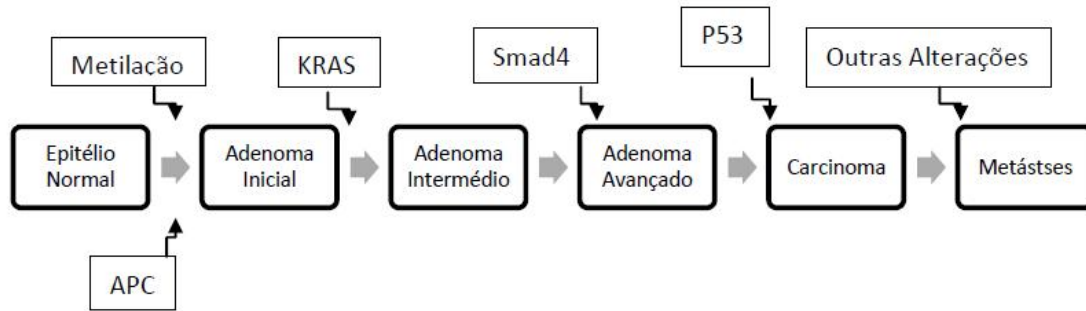
A longo dos últimos anos, têm sido identificados genes com diferentes funções na carcinogénese: os oncogénos, os proto-oncogenes, os genes supressores tumorais, os genes de reparação

do DNA. Os oncogénos e os proto-oncogenes (exemplo: o c-RAS) são genes indutores de cancro, que podem ser ativados a partir de mutações, translocações e amplificações induzidas por agentes carcinogénicos, que podem ser virais, químicos, físicos ou biológicos. A alteração das proteínas codificadas pelos oncogenes podem afetar o controlo do crescimento da célula, levando ao aparecimento do tumor. Os genes supressores tumorais (exemplo: P53 e APC), têm um papel fundamental no controlo da proliferação celular, através da sua ação inibidora do crescimento.<sup>8</sup> Os genes de reparação do DNA codificam proteínas envolvidas na reparação do DNA (exemplo: MLH1 e MSH2), contribuindo deste modo para a manutenção da estabilidade e integridade do genoma. Finalmente, os genes pró-apoptose (exemplo: BCL2) estão envolvidos na regulação da morte celular por apoptose, codificando proteínas com funções de promoção da morte celular e de controlo da proliferação celular exagerada.<sup>8</sup>

Em 1990, Fearon e Vogelstein, propuseram um modelo genético designado como sequência adenoma-carcinoma, para explicar o processo de carcinogénese do CCR. De acordo com este modelo, a sequência inicia-se através de uma alteração genética no gene APC (*Adenomatous Polyposis Coli*). Em tumores sem mutação no gene APC, podem ocorrer mutações no genes *cadherin associated protein* (CTNNB1) ou *axin 2* (axin2) – genes que pertencem à via de sinalização intracelular Wnt.<sup>9</sup> Com a alteração da via de sinalização intracelular RAS/RAF/MAPK/ERK, que é uma das principais cascatas de transdução de sinais proliferativos originados em recetores de fatores de crescimento, ocorre a progressão de adenoma precoce para adenoma tardio. Os ras são proto-oncogenes que codificam uma proteína que atua como uma GTPase, importante em várias vias de sinalização celular, nomeadamente da proliferação e supressão da apoptose. Em cerca de 50% dos casos dos casos de CCR, esta alteração tem origem na ativação do oncogene KRAS (*Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*). Há assim a possibilidade de uma percentagem significativa de tumores responder a terapêuticas dirigidas a recetores celulares específicos, como a terapia anti-EGFR<sup>10</sup>. Em cerca de 20% dos casos de CCR, pode ocorrer devido à ativação do BRAF (*v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*).<sup>9</sup>

Por fim, a progressão para carcinoma surge com a inativação do gene supressor de tumor proteína 53, responsável pela inibição do crescimento e pela ativação da morte celular quando é induzido stress celular.<sup>9</sup>

No decorrer do ciclo tumoral, diversos processos celulares são alterados, tais como, a adesão celular, a angiogénese, a sinalização intracelular, a apoptose e os fatores de crescimento. No final, as células apresentam as características necessárias à formação do tumor, adquirindo um crescimento resregulado.<sup>11</sup>



**FIG. II.1** – A Tumorigênese Colo-Rectal (Fearon, E.F.; Vogelstein, B.; 1990). Adaptado de Ferreira, A.L.M. - *Marcadores Genéticos no Cancro Colorretal: Importância no Diagnóstico e Terapêutica*.

Cerca de 75% dos pacientes com CCR, não evidenciam ter herdado o distúrbio. Os restantes 25% têm uma história familiar de CCR, o que se sugere uma contribuição hereditária, exposições comuns entre os membros da família, ou uma combinação de ambos.<sup>7</sup> Foram identificadas mutações genéticas como a causa de risco de cancro hereditário em algumas famílias marcadas como propensas a CCR. Estas mutações são responsáveis por apenas 5-6% dos casos de CCR, e embora representem uma pequena fração da ocorrência de CCR, têm permitido através de estudos de base molecular, um melhor conhecimento sobre os mecanismos específicos que contribuem para o desenvolvimento do CCR esporádico. (*Genetics of Colorectal Cancer* - National Cancer Institute. Disponível em <http://www.cancer.gov>. Acesso em Setembro 2018)

As mutações com importância funcional e/ou seletiva podem resultar de instabilidade cromossômica, que é caracterizada por aneuploidias ou ganho/perda de cromossomas, ou de instabilidade de microssatélites, com presença de mutações de inserção ou deleção nas sequências repetitivas de ADN. Cerca de 85% dos CCR apresentam instabilidade cromossômica, com ganhos, perdas cromossômicas ou perda de heterozigotia. Por outro lado, cerca de 15% dos CCR esporádicos demonstram instabilidades de microssatélites associadas a alterações em genes de mismatch repair.<sup>13</sup>

Estudos de sequenciação indicam que cerca de 23 a 32 genes estão frequentemente mutados no CCR, incluindo os seguintes genes: APC, TP53, KRAS, PIK3CA (*phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase*), FBXW7 (*F-box/WD repeat-containing protein 7*), SMAD4 (*SMAD family member 4*), TCF7L2 (*transcription factor 7-like 2*), CTNNB1 (*catenin beta 1*), N-RAS (*neuroblastoma RAS viral oncogene homolog*) e SOX9 (*transcription factor SOX9*).<sup>14</sup> Estes genes podem ser divididos em três classes: genes supressores de tumor, oncogenes e genes de reparação do ADN. Os genes supressores de tumores constituem a classe mais importante de genes responsáveis pelo cancro hereditário e representam a classe de genes responsáveis pela Polipose Adenomatosa Familiar (PAF) e pela Polipose Juvenil (PJ) que como o nome indica, são doenças em que ocorre o surgimento de pólipos no colón e reto durante a infância e adolescência. Os genes de reparação de DNA, são responsáveis

pelo Cancro Colorretal Hereditário não Associado à Polipose (HNPCC), e correspondem a uma grande fração do CCR hereditário.<sup>15</sup>

**TAB. II.1** – Principais oncogenes e genes supressores de tumor envolvidos na carcinogénese colo-rectal (Fearon, E.R. 2011). Adaptado de FERREIRA, A.L.M. - *Marcadores Genéticos no Cancro Colorretal: Importância no Diagnóstico e Terapêutica*.

Oncogenes	Frequência Estimada
KRAS	50%
NRAS	<5%
PIK3CA	15-25%
BRAF	10-20%
EGFR	5-15%
CDK8	10-15%
CMYC	5-10%
CCNEI	5%
CTNNBI	<5%
NEU(HER2)	<5%
MYB	<5%
Genes Supressores de Tumor	Frequência Estimada
P53	60-70%
APC	70-80%
FBWW7	20%
PTEN	10%
SMAD4	10-15%
SMAD2	5-10%
SMAD3	5%
TGβIIR	10-15%
TCFL2	5%
ACVR2	10%
BAX	5%

Após o estabelecimento do diagnóstico é importante classificar a neoplasia quanto à sua extensão e local. O estadiamento do cancro pretende descrever alguns aspetos da sua evolução, como

localização no órgão, se existe ou não disseminação e se afeta funções de outros órgãos. Conhecer o estágio do tumor é importante na definição de estratégias de tratamento e no estabelecimento do prognóstico do doente.<sup>16</sup>

Existem várias classificações para a avaliação da extensão do CCR: a classificação da International Union Against Cancer (UICC) e da American Joint Committee on Cancer (AJCC) que são idênticas, a classificação de Dukes e classificação de Astler-Coller. A classificação da UICC/AJCC baseia-se no sistema Tumour-Node-Metastasis (TNM), e assenta nas características do tumor (Tumor – T), na invasão de gânglios locoregionais (Nódulos - N) e na disseminação à distância.<sup>17</sup>

**TAB II.2** – Classificação dos tumores malignos do cólon e reto. (Sobin, M.K.G. e Wittekind, C.H. – *Classification of Malignant Tumours*, 2009). Fonte: PEREIRA, M., A. F. – *Importância Clínica de novos Marcadores Moleculares no Cancro Colorretal*.

<b>T – Tumor Primário</b>	
<b>TX</b>	Tumor primário não avaliado.
<b>Tis</b>	Carcinoma <i>in situ</i> : intraepitelial ou invade a lâmina própria.
<b>T0</b>	Sem evidência de tumor primário
<b>T1</b>	Tumor invade apenas a submucosa.
<b>T2</b>	Tumor invade muscular própria.
<b>T3</b>	Tumor invade subserosa e tecidos pericólicos ou perirretais não peritonealizados.
<b>T4</b>	Tumor invade diretamente outros órgãos ou estruturas e perfura o peritoneu visceral
<b>T4a</b>	Tumor perfura o peritoneu visceral.
<b>T4b</b>	Tumor invade diretamente outros órgãos ou estruturas.
<b>N – Gânglios Regionais</b>	
<b>NX</b>	Gânglios regionais não avaliados.
<b>N0</b>	Gânglios regionais não invadidos.
<b>N1</b>	Metástases em 1 a 3 gânglios linfáticos regionais.
<b>N1a</b>	Metástases em 1 gânglio linfático regional.
<b>N1b</b>	Metástases em 2 a 3 gânglios linfáticos regionais.
<b>N1c</b>	Metástases na subserosa ou nos tecidos pericólicos ou perirretais não peritonealizados sem metástases nos gânglios linfáticos regionais.
<b>N2</b>	Metástases em mais de 4 gânglios linfáticos regionais.
<b>N2a</b>	Metástases em 4 a 6 gânglios linfáticos regionais.
<b>N2b</b>	Metástases em 7 gânglios linfáticos regionais.
<b>M - Metástases à distância</b>	
<b>M0</b>	Ausência de metástases à distância.
<b>M1</b>	Metástases à distância.
<b>M1a</b>	Metástases em um órgão (fígado, pulmão ou ovário) ou gânglios não regionais.
<b>M1b</b>	Metástases em mais que um órgão ou peritoneu ou gânglios não regionais.





### CAPÍTULO III

#### O Rastreio do Cancro Colorretal

A União Europeia tem a maior taxa de incidência de CCR e a segunda maior taxa de mortalidade em CCR em ambos os sexos, com cerca de 446 000 novos casos diagnosticados por ano e uma taxa de mortalidade de 214 000 casos anualmente. Em Portugal, podemos encontrar um padrão semelhante ao de outros países desenvolvidos. Estudos indicam que o cancro é a segunda causa de morte em Portugal, sendo que o CCR é responsável por 15% dos óbitos por cancro, tendo sido identificadas 7129 incidências de CCR com 3776 casos de mortalidade em 2012.<sup>3</sup>

Verifica-se uma tendência progressivamente crescente da mortalidade respeitante a algumas neoplasias, especialmente a do CCR. Como tal, é de extrema importância a elaboração e implementação de várias estratégias para a prevenção e controlo das doenças oncológicas.<sup>4</sup>

A redução da incidência e mortalidade por cancro é possível através de ações de promoção da saúde e prevenção da doença, tais como a implementação de programas de rastreio. Atualmente, existem estudos científicos que demonstram a eficácia dos programas de rastreio generalizado para o CCR.<sup>20</sup>

O rastreio não tem como objetivo o diagnóstico de cancro, já que os exames de rastreio não são exames de diagnóstico. O rastreio tem como meta a diminuição do impacto da doença na população, identificando lesões pré-malignas ou detetando o cancro precocemente, com vista a estabelecer o tratamento rapidamente e a evitar complicações decorrentes de fases avançadas do mesmo.<sup>21</sup>

O Conselho da União Europeia produziu uma recomendação específica (2003/878/CE), propondo aos estados membros a realização de rastreios da população para o cancro da mama, cancro do colo do útero e cancro colorretal, definindo métodos e populações alvo.<sup>22</sup> (*Recomendação do Conselho de 2 de Dezembro de 2003 sobre o Rastreio do Cancro (2003/878/CE)*). Disponível em <http://eur-lex.europa.eu>. Acesso em Setembro 2018)

Um plano de rastreio é baseado numa série de intervenções, desde a identificação da população alvo, à realização de exames complementares de diagnóstico a uma população elegível saudável, até à aplicação da terapêutica e consequente vigilância, sendo que o seu objetivo principal é diminuir a incidência e mortalidade da doença. O principal indicador de eficácia de um rastreio é a redução da mortalidade da doença rastreada.<sup>22</sup>

Em 1968, a Organização Mundial de Saúde (OMS), definiu que para a implementação de um programa de rastreio, torna-se necessário reunir um conjunto de condições.<sup>21</sup> Desde aí, que se tem modernizado e adaptado aos diferentes sistemas de saúde, este conjunto de regras para a implementação de um bom programa de rastreio:

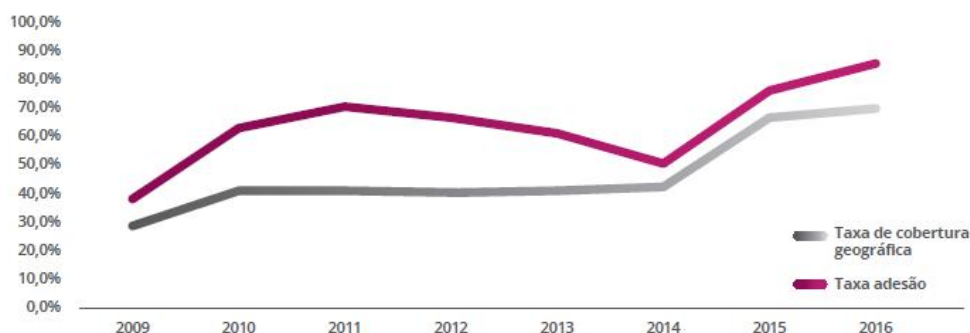
- A doença deve ser um importante problema de saúde, individualmente e para a comunidade;

- Existência de um tratamento implementado ou estratégia reconhecida para pacientes com a doença;
- Existência de testes com capacidade para rastrear e diagnosticar a doença numa fase precoce;
- A doença deve ter uma fase reconhecidamente latente ou precocemente sintomática;
- Os exames devem ser seguros e bem aceites pela população alvo;
- A história natural da doença deve ser bem conhecida;
- Os custos devem ser economicamente balanceados relativamente a uma possível expansão para todo serviço de saúde.
- Existência de vantagem no uso de terapêutica numa fase assintomática;
- Os voluntários rastreados devem receber informação adequada sobre os prós e os contras do rastreio;
- Existência de medidas que garantam uma igualdade no acesso da população ao rastreio;
- Cumprimento de uma boa relação custo/efetividade.<sup>21</sup>

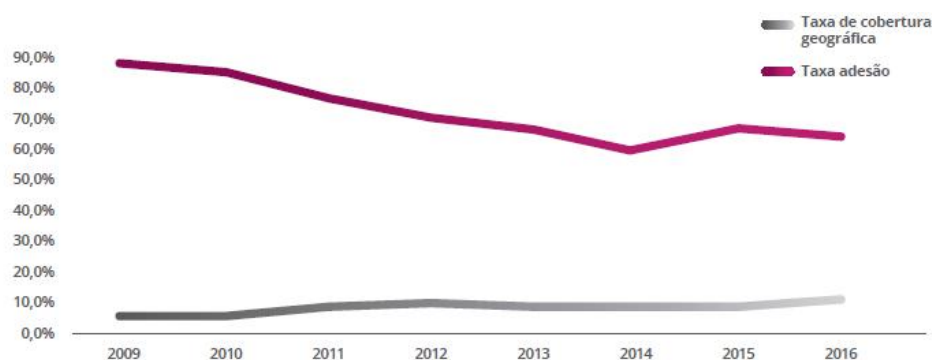
Os programas de rastreio oncológico em Portugal, têm evoluído significativamente desde 2009, tendo-se registado, um grande aumento do número de utentes rastreados e melhoria significativa das taxas de adesão até 2016.<sup>23</sup> No nosso país, dos rastreios oncológicos em curso (cancro da mama, cancro do colo do útero e cancro colorretal), o do CCR, é o que apresenta claramente maior necessidade de investimento. (*Programa Nacional para as Doenças Oncológicas 2017*. Disponível em <http://www.dgs.pt>. Acesso em Setembro 2018)



**FIG.III.1** – Evolução das taxas de cobertura geográfica e de adesão do rastreio do cancro da mama em Portugal (2009-2016).<sup>23</sup> Fonte: DGS/ARS 2017 (*Programa Nacional para as Doenças Oncológicas 2017*. Disponível em <http://www.dgs.pt>. Acesso em Setembro 2018)



**FIG.III.2** – Evolução das taxas de cobertura geográfica e de adesão do rastreio do cancro do colo do útero em Portugal (2009-2016).<sup>13</sup> Fonte: DGS/ARS 2017 (*Programa Nacional para as Doenças Oncológicas 2017*. Disponível em <http://www.dgs.pt>. Acesso em Setembro 2018)



**FIG.III.3** – Evolução das taxas de cobertura geográfica e de adesão do rastreio do cancro do cólon e reto em Portugal (2009-2016).<sup>13</sup> Fonte: DGS/ARS 2017 (*Programa Nacional para as Doenças Oncológicas 2017*. Disponível em <http://www.dgs.pt>. Acesso em Setembro 2018)

Estão em desenvolvimento programas piloto disseminados nacionalmente que visam permitir o alargamento geográfico progressivo nos próximos anos.<sup>23</sup> Neste projeto piloto, está inserido o programa de rastreio do CCR na Região de Lisboa e Vale do Tejo. Este programa, inclui os Agrupamentos de Centros de Saúde (ACES) da Península de Setúbal (ACES Almada-Seixal, ACES da Arrábida e ACES do Arco Ribeirinho), estando previsto um tempo mínimo de 2 anos, de modo a garantir a cobertura à população alvo.

Para a realização do Programa de rastreio do CCR da área, foi celebrado em Julho de 2017 um protocolo entre a Administração Regional de Saúde de Lisboa e Vale do Tejo, I.P. (ARSLVT, IP) e o Hospital Garcia de Orta. Este programa preconiza a realização de teste imunológico quantitativo de amostra única para a pesquisa de sangue oculto nas fezes (PSOF) no SPCHGO em todos os utentes

elegíveis para o rastreio, inscritos nos ACES mencionados, e a realização de colonoscopias no Serviço de Gastroenterologia do HGO para os doentes com resultado positivo de PSOF (apenas de ACES Almada-Seixal e ACES Arco Ribeirinho – o Centro Hospitalar de Setúbal (CHS) assegura as colonoscopias necessárias aos utentes do ACES Arrábida).

No rastreio oportunístico do CCR devem ser incluídos os utentes assintomáticos (homens e mulheres) com idades compreendidas entre os 50 e os 74 anos. Não são incluídos no rastreio, os utentes que apresentem sinais e/ou sintomas sugestivos da existência de patologia do cólon ou do reto (devendo ser submetidos a colonoscopia total), ou os doentes com antecedentes familiares de primeiro grau de adenoma ou de CCR, doença inflamatória intestinal e síndromes hereditárias de CCR.<sup>24</sup> (Norma 003/2014. *Rastreio Oportunístico do Cancro do Colón e do Reto*. Disponível em <http://www.nghd.pt>. Acesso em Setembro 2018)

Durante um ciclo de 2 anos, a população alvo é convidada a participar no rastreio através de carta de informação enviada pelas diferentes ACES, com indicação do período em que se poderá deslocar à sua unidade de saúde. Nesta, será submetido a uma consulta de anamnese, com recolha de informação clínica e administrativa, assinatura do consentimento e entrega do kit de recolha de fezes que é acompanhado por um folheto explicativo. Na sua unidade de saúde, o utente é instruído pelo médico e/ou enfermeiro, de modo a conseguir fazer a colheita corretamente na sua residência. Após a colheita, o utente deve entregar o kit na sua unidade de saúde, onde é registada a data de recolha.

Todas as informações (utente, data de recolha, resultados, etc.) são disponibilizados numa plataforma informática nacional de rastreios denominada como SiiMA Rastreios, o que permite uma melhor gestão e organização do processo por parte de todos os intervenientes.

**TAB. III.1** – Objetivos específicos do Programa de Rastreio do CCR implementado pela ARSLVT, IP. Fonte: ARSLVT, IP

<b>Características do Rastreio</b>	<b>Populacional</b>
População Alvo	50-74 anos
Teste de Rastreio	PSOF (Teste Imunológico Quantitativo)
Periodicidade	2/2 anos
Local do Rastreio	Unidades de Saúde dos ACES Península Setúbal
Centros de Leitura	SPCHGO
Emissão de Resultados	HGO
Investigação Adicional (colonoscopia)	HGO e CHS

## **CAPÍTULO IV**

### **A Pesquisa de Sangue Oculto nas Fezes**

A pesquisa de sangue oculto nas fezes (PSOF) é um exame laboratorial que permite detetar a presença de hemoglobina humana nas fezes, com o intuito de auxiliar no diagnóstico de perturbações gastrointestinais como pólipos, adenomas e carcinoma colorretal. O PSOF foi adotado como teste primário no rastreio do cancro colorretal, assentando no princípio que o carcinoma induz a uma hemorragia intestinal oculta que pode ser facilmente identificada através deste teste. Existem 2 tipos de testes para a pesquisa de sangue oculto nas fezes: o Teste de Haemocul/Guaiac based e o Teste Imunoquímico.

#### **IV.1 - Teste de Haemocult/Guaiac based**

A PSOF foi desenvolvida em 1967 por David H. Gregor utilizando uma modificação do teste de guaiac desenvolvido por Van Deen em 1864. Este é um teste colorimétrico qualitativo, e baseia-se na atividade da peroxidase da porção heme da hemoglobina, causando a oxidação de um composto fenólico (ácido alfa-guaicónico) pela ação do peróxido de hidrogénio.<sup>25</sup> Quando uma solução contendo peróxido de hidrogénio é gotejado sobre um papel guaiac, ele oxida o ácido alfa-guaicónico formando uma quinona de cor azulada, numa reação química que demora aproximadamente 30 segundos.<sup>26</sup> Deste modo, se houver presença de hemoglobina nas fezes, haverá a formação de um composto azul ou azul-esverdeado.

David H. Gregor, utilizou este teste PSOF para fazer um estudo de rastreio a uma população de homens e mulheres com idades superiores aos 45 anos, e verificou que a maioria dos seus doentes com CCR, apresentavam um resultado positivo, especialmente se efetuada em 3 colheitas de fezes.<sup>27</sup> Gregor denominou esta técnica como teste de Haemocult. Este teste baseia-se na colheita de 3 amostras de fezes, que são espalhadas através de uma espátula, numa camada fina de papel que se encontra dentro de um envelope teste, e onde são aplicadas 2 gotas de solução resina de guaiac para revelação. Caso seja positivo, o papel do envelope teste adquire uma coloração azul. Caso seja negativo, não ocorre mudança de coloração.

Devido ao facto de o teste ser baseado na reação com a heme-peroxidase, pode existir a ocorrência de falsos-positivos, devido a reação com outras peroxidases presentes nas fezes devido à ingestão de certos alimentos e medicamentos. Instituiu-se por isso uma dieta especial e rigorosa 3 a 4 dias antes da colheita da amostra: o paciente não deve ingerir carne vermelha, certas frutas como banana e melão, hortaliças e frutícolas como nabo, brócolos, couve-flor, espinafre e tomate. Restringe-se igualmente o uso de medicamentos como os corticosteroides, os quimioterápicos e a aspirina. Suplementos alimentares contendo altas doses de vitamina C estão também restringidos por

apresentarem o potencial de provocar pequenas perdas sanguíneas no trato gastrointestinal superior. Bebidas alcoólicas devem ser descontinuadas nos 7 dias que antecedem a colheita do produto.

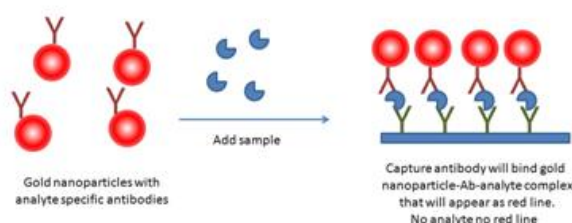
O teste Haemocult é uma técnica simples, de baixo custo e apresenta riscos mínimos apresentando-se como um teste bastante acessível em relação a outros métodos. No entanto apresenta uma especificidade baixa e uma sensibilidade também relativamente baixa, e que segundo alguns estudos varia conforme a localização da lesão. Apresenta também uma taxa elevada de resultados falsos-positivos.<sup>28</sup>

#### IV.2 - Teste Imunoquímico (FIT- Fecal Immunochemical Test)

Os Testes Imunoquímicos (FIT) podem-se apresentar como testes qualitativos (em que o resultado é positivo ou negativo) ou quantitativos (em que é estimada a concentração de hemoglobina fecal).

O Teste Imunoquímico Qualitativo, desenvolvido em 1995 é um teste de imunocromatografia de captura que utiliza anticorpos monoclonais anti-hemoglobina humana, possibilitando a deteção de hemoglobina em níveis muito baixos (0,05UI/ml) presentes nas fezes, com um tempo de reação curto (cerca de 5 minutos).

O teste é realizado numa matriz constituída por uma membrana de nitrocelulose coberta por um acetato transparente para facilitar a visualização do teste. O anticorpo monoclonal anti-hemoglobina humana é fixado na membrana em forma de linha seguido de uma segunda linha onde está aplicado o anticorpo de controle. Um conjugado anticorpo anti-hemoglobina humano–ouro coloidal é colocado na membrana, antes da linha de teste. O ouro coloidal é um agente colorimétrico, que será o revelador da interação antígeno-anticorpo, adquirindo uma cor rosada. A amostra, quando aplicada, irá percorrer cromatograficamente a membrana por ação capilar. Caso haja presença de hemoglobina na amostra, esta irá ligar-se ao conjugado anti-hemoglobina humana da membrana, resultando no aparecimento de uma linha colorida na zona de teste indicando um resultado positivo. Como a amostra continua a migrar na membrana, forma-se uma segunda linha colorida onde está aplicado o anticorpo de controlo, o que indica que o teste se processou adequadamente.<sup>25,29</sup>



**FIG. IV.2.1** – Formação do imunocomplexo antígeno-anticorpo conjugado com o ouro coloidal. Fonte: <https://biosensing.wordpress.com>



FIG. IV.2.2 – Componentes do Teste Imunoquímico. Fonte: <https://www.biomedicinapadiao.com.br>

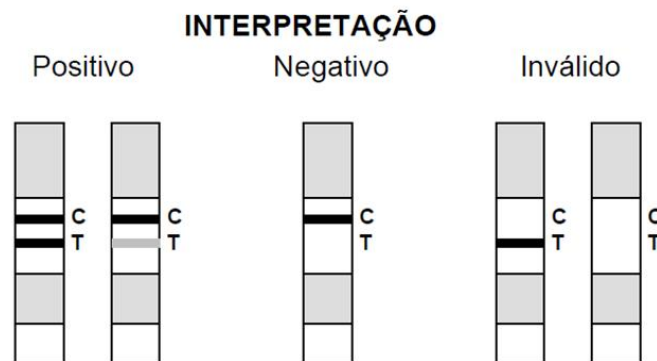


FIG. IV.2.3 – Interpretação dos resultados do Teste Imunoquímico/Imunocromatográfico. Fonte: <https://www.biomedicinapadiao.com.br>

Estes testes possuem também a vantagem de dispensarem o uso de reagentes adicionais, equipamento técnico e pessoal técnico especializado, não sendo necessário um ambiente laboratorial para a realização do ensaio. Uma desvantagem associada a estes testes é a subjetividade na interpretação dos resultados, podendo este problema ser contornado com o recurso a leitores automatizados.

O Teste Imunoquímico Quantitativo mede a concentração da hemoglobina numa amostra fecal através da utilização de um conjugado anticorpo monoclonal ou policlonal anti hemoglobina humana ligado a um polissacárido (geralmente latex). Este conjugado, ao ligar-se à hemoglobina presente na amostra irá modificar a turbidez da amostra, o que permite a quantificação da hemoglobina.<sup>30</sup>

O Teste Imunoquímico Quantitativo permite a escolha do cut-off da concentração da hemoglobina fecal que pode desencadear uma colonoscopia de follow-up. Existem já diversos equipamentos disponíveis no mercado, mas que podem variar na técnica ou dispositivo de colheita, número de amostras, estabilidade da hemoglobina após a colheita, metodologia analítica e características do anticorpo.<sup>31</sup>

A principal vantagem deste tipo de ensaios, é o de eliminar a necessidade de dieta alimentar antes da colheita, pois é um método dirigido à captura do antígeno da hemoglobina humana. Os alimentos com atividade peroxidase como a carne vermelha e algumas frutícolas e hortícolas, não

aumentam a taxa de falsos positivos, conferindo assim maior especificidade. Apesar de ambos terem um custo mais elevado que o Teste Haemocult/Guaiac based, o seu potencial custo-benefício pode ser superior, na medida em que são exigidas menos colonoscopias posteriores a um falso-positivo.<sup>28</sup> Este é por isso o método de eleição para a realização de rastreios populacionais ao CCR.



## CAPÍTULO V

### Metodologia utilizada no Laboratório de Bioquímica do SPCHGO

#### V.1 - Chemtrue® One-Step FOB Test.

Antes da celebração do protocolo entre a ARSLVT e o HGO para a realização do programa de rastreio do CCR, a metodologia utilizada para o teste PSOF era o teste imunoquímico com a apresentação comercial Chemtrue® One-Step FOB Test.



**FIG. V.1.1** – Apresentação comercial do teste Chemtrue® One-Step FOB Test. Fonte: <http://www.chemtronbio.com>

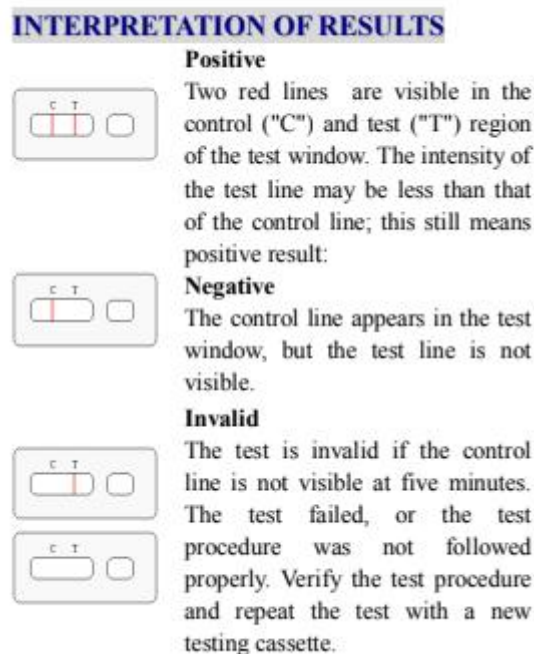
O Chemtrue® One-Step FOB Test é um teste rápido, imunocromatográfico, para deteção qualitativa de hemoglobina humana em amostras fecais, através da interpretação visual de desenvolvimento de cor. Este teste utiliza a metodologia imunoquímica, com ligação da hemoglobina presente na amostra a um conjugado anti-hemoglobina humana – ouro coloidal, com o aparecimento de uma linha rosada na linha denominada como T (teste) no caso de um resultado positivo.<sup>32</sup>

O kit dispõe de um tubo coletor de amostra, composto por 2 ml de solução salina (0,9% NaCl com 0,02% de Azida de Sódio) e de um dispositivo teste em involucro fechado com sílica conservante.

Para o procedimento do teste, era exigido ao doente 3 amostras de fezes colhidas em contentor esterilizado individual. Em cada amostra, era introduzido o aplicador do tubo coletor, tendo o cuidado de “picar” vários locais da amostra fecal. O aplicador era novamente introduzido no tubo coletor e fechado, realizando em seguida uma homogeneização eficaz da amostra com a solução de extração.

Após a correta identificação do dispositivo teste com o número de laboratório do doente, eram aplicadas, com o tubo coletor, 2 a 3 gotas (90 a 135µl) da solução homogeneizada na janela de amostra

do dispositivo teste. O resultado devia ser interpretado ao fim de 5 minutos, não excedendo os 8 minutos para a leitura de cor. O Chemtrue® One-Step FOB Test consegue detetar concentrações de hemoglobina a partir de 40µg/l.



**FIG. V.1.2** – Interpretação visual dos resultados do teste Chemtrue® One-Step FOB Test. Fonte: Chemtrue® One-Step FOB Test – Product Code 9001C (2010). Shanghai Chemtron Biotech Co., Lda

O ensaio Chemtrue® One-Step FOB Test apresentava algumas desvantagens, entre elas:

- A difícil interpretação dos resultados: em alguns ensaios, a intensidade ou existência da linha de teste era muito discutível, tornando-se necessário recorrer a mais do que um operador para fazer a leitura do resultado;

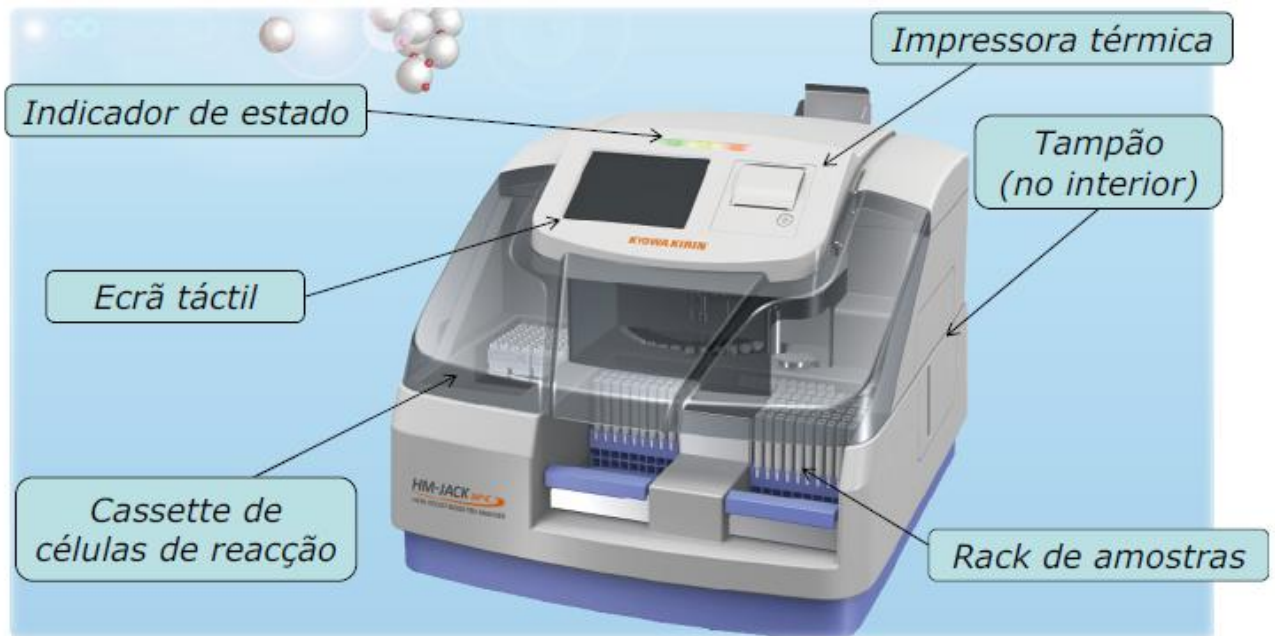
- É uma técnica manual: a média mensal de testes PSOF executados no SPCHGO rondava os 40. Após a celebração do protocolo para o rastreio do CCR em julho de 2017, a média aumentou para os 240 testes (testes do rastreio e os testes requisitados pelos clínicos em geral). Com tão substancial aumento, tornou-se inviável a utilização deste tipo de ensaio manual, sendo necessário recorrer a uma técnica automatizada;

- É um teste qualitativo: não permite a quantificação do resultado. O protocolo para o rastreio do CCR preconiza a utilização de um método imunológico quantitativo (as guidelines europeias de 2010 para a qualidade no diagnóstico de cancro colorretal recomendam a utilização de um ensaio FIT quantitativo como método de 1ª linha para o rastreio do cancro colorretal.<sup>21</sup>);

Face à nova realidade (protocolo para o rastreio do CCR), o SPCHGO tomou como prioridade a escolha de um equipamento imunoquímico automatizado para a realização do teste PSOF. Após a

realização de concurso público, a decisão caiu sobre a proposta do equipamento HM-JACK arc apresentada pela A. Menarini Diagnostics.

## V.2 – Equipamento HM-JACK arc



**FIG. V.2.1** – Componentes do Equipamento HM-JACK arc. Fonte: Kyowa Medex Co., Ltd – A. Menarini Diagnostics.

O HM-JACK arc é um autoanalisador de tecnologia FIT para quantificação da concentração da hemoglobina em amostras fecais através de um método de nefelometria de esfera de integração. Permite o carregamento automático, com capacidade para 80 amostras na zona de carga, e um desempenho de 200 testes/hora.

O equipamento apresenta uma tecnologia inovadora, com a utilização de um tubo coletor de amostra fecal de design patenteado, o HemoAuto MC, para a realização do ensaio, sem necessidade de manipulação da amostra por parte do operador. Este novo dispositivo permite um procedimento eficiente na fase pré-analítica, pois garante a precisão da colheita (2mg de amostra fecal), independentemente de ser efetuada por um paciente ou por um profissional.

O tubo coletor HemoAuto MC é constituído por:

- Um stick coletor que contem na ponta 2 pequenos poços de forma hexagonal que garantem a colheita e o armazenamento de 2 mg de amostra fecal;
- Um separador de borracha que remove o excesso de amostra;
- 2 ml de tampão salino para a diluição e homogeneização da amostra fecal;
- Um selo de camada fina que permite a perfuração pela pipeta do autoanalisador;

- Uma janela indicadora para confirmação de uma colheita eficaz.

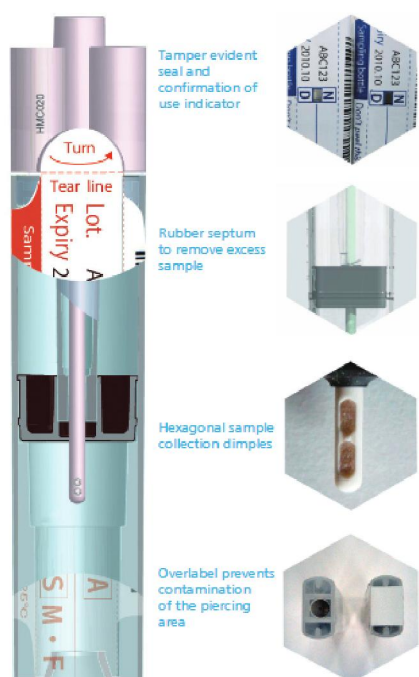


FIG. V.2.2 – Imagem do tubo coletor HemoAuto MC. Fonte: <https://www.alphalabs.co.uk>

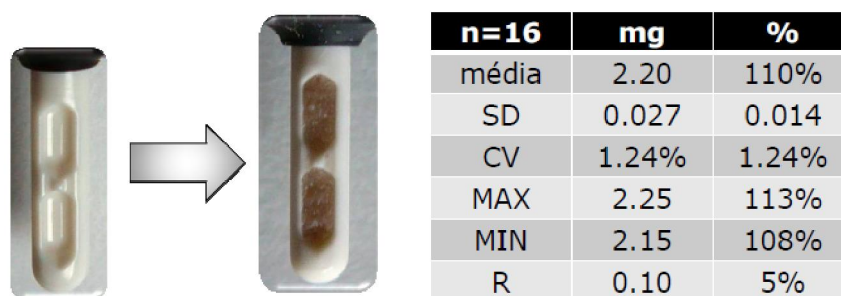


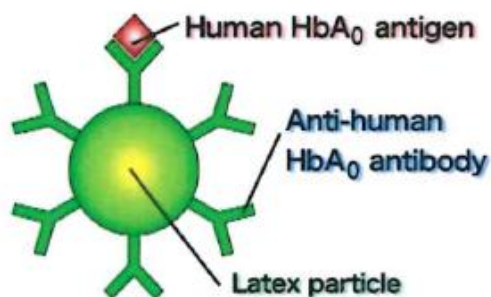
FIG. V.2.3 – Precisão da colheita do tubo coletor HemoAuto MC. Fonte: Kyowa Medex Co., Ltd – A. Menarini Diagnostics.



**FIG. V.2.4** – O tubo coletor HemoAuto MC e a respetiva rack de amostras. Fonte: Kyowa Medex Co., Ltd – A. Menarini Diagnostics.

As características exclusivas deste dispositivo de colheita estão otimizadas para funcionar em comunhão com o autoanalisador HM-JACK arc através da utilização de racks de amostra patenteadas para a introdução do tubo coletor HemoAuto MC no equipamento.

O ensaio inicia-se com a aspiração de 90µl do reagente latex Extel HemoAuto HS pela pipeta de reagente, juntamente com 190µl do tampão Extel HemoAuto para uma cuvete de reação de uso único. Esta suspensão de latex está sensibilizada com anticorpos policlonais anti hemoglobina humana.

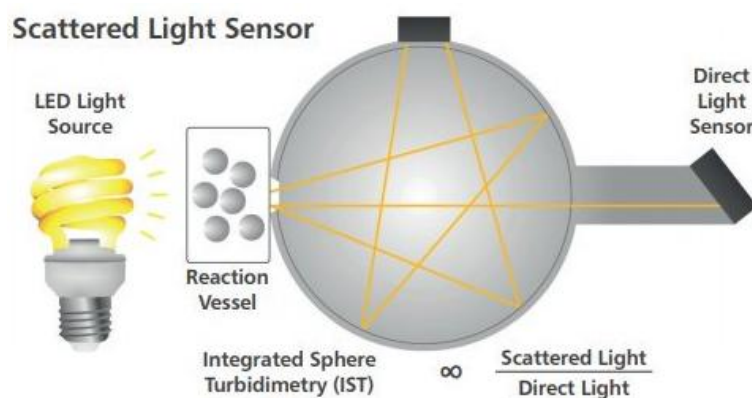


**FIG. V.2.5** – Partícula de latex sensibilizada com anticorpos anti hemoglobina humana. Fonte: Fradera, J. M. A. *Aspectos Técnicos y Clínicos de la Detección de Hemoglobina en Heces*.

Posteriormente, a pipeta de amostra, através de perfuração do selo do tubo coletor, irá pipetar 20µl da suspensão de amostra fecal, que será dispensada na cuvete que contém já a suspensão de latex, dando início à reação. Caso haja presença de hemoglobina na amostra, ocorrerá uma reação de aglutinação das partículas de latex, levando a uma mudança na turbidez da suspensão.

Após uma janela de tempo, a cuvete de reação é colocada na posição de leitura do detetor da esfera de integração, onde é efetuada a primeira medição fotométrica (ISTT1). Após outro período de

tempo definido, é efetuada uma segunda leitura fotométrica (ISTT2). A diferença na turbidez na esfera de integração entre as duas leituras fotométricas ( $\Delta IST = ISTT2 - ISTT1$ ), em que IST: Integrating Sphere Turbidity) é calculada pelo sistema operativo do equipamento, efetuando o cálculo da concentração de hemoglobina recorrendo a uma curva de calibração Master de 7 pontos previamente calculada.



**FIG. V.2.6** – Princípio de detecção por nefelometria de esfera de integração. Fonte: <https://www.alphalabs.co.uk>

O princípio de detecção do HM-JACK arc é a nefelometria/turbidimetria de esfera de integração. Nefelometria e turbidimetria são técnicas analíticas utilizadas para medir a passagem de luz dispersa em direção a um detetor. A dispersão da luz é um fenómeno físico que resulta da interação da luz com partículas em solução. Esta dispersão ocorre quando a energia luminosa colide elasticamente com uma molécula e espalha a luz em várias direções. Alguns fatores como o tamanho da partícula, o comprimento de onda, a distância de observação, o efeito de polarização da luz incidente, a concentração e o peso molecular das partículas influenciam a dispersão da luz.<sup>33</sup>

A turbidez de uma solução ocasiona a diminuição do feixe de luz incidente quando este encontra partículas em suspensão. A medição desta redução na intensidade da luz é a turbidimetria. A nefelometria é a detecção de luz dispersa ou refletida em direção a um detetor que não se encontra na trajetória direta da luz transmitida (geralmente a 30° ou 90°).<sup>33</sup>

Os resultados da concentração de hemoglobina fecal são expressos em ng/ml, apresentando um intervalo de medição entre os 7-400ng/ml com um cut-off recomendado de 15ng/ml.

$$\text{ng/ml} = \frac{\mu\text{g Hb} / \text{g fezes} \times \text{massa de amostra fecal adicionada (g)} \times 1000}{\text{volume de tampão no tubo coletor (ml)}}$$

A variabilidade de equipamentos com tecnologia FIT quantitativos existentes no mercado, e que utilizam diferentes tipos de amostragem, não estão uniformizados quanto à massa de amostra fecal e ao volume de tampão do tubo coletor. Esta diferença na amostragem, tem dificultado não só a comparação entre métodos, como a expressão dos resultados, afetando o valor da concentração de hemoglobina, o que pode levar a diferentes interpretações clínicas, assim como a diferentes cut-offs recomendados.<sup>31</sup>

A qualidade dos resultados é assegurada diariamente através da passagem do controlo de qualidade interno. Este controlo é quantitativo sendo composto por dois níveis, denominados como alto (H) e baixo (L), e que são fornecidos pelo representante. O equipamento é composto por um middleware que permite não só a gestão do controlo de qualidade através de apresentação de gráficos de Levey-Jennings, como a gestão, validação e rastreabilidade dos resultados das amostras.



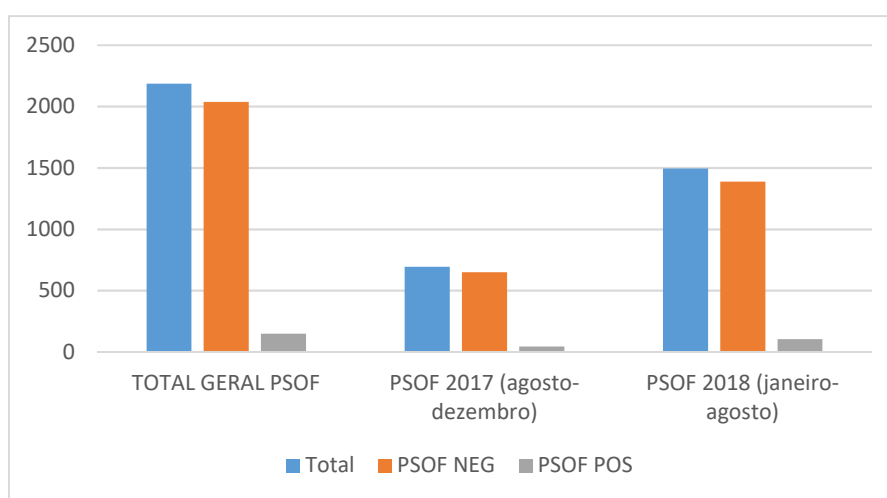


## CAPÍTULO VI

### Apresentação de resultados

Verificou-se que no âmbito do programa de rastreio do CCR (RCCR), apenas 9 unidades das ACES da Península de Setúbal estão a ser cobertas à data deste relatório de atividades.

Em Agosto de 2018, o SPCHGO fez um balanço através dos dados reunidos na plataforma SIIMA Rastreios. Em cerca de 2200 testes PSOF realizados, pode-se verificar que a prevalência de casos positivos ronda os 7%, sendo que o número de testes rastreados até agosto de 2018 duplicou.



**GRAF. V.1** – Prevalência de casos positivos nos testes PSOF realizados pelo SPCHGO no âmbito do programa de RCCR.



## CAPÍTULO VII

### Discussão e conclusão

O Programa de rastreio do CCR implementado pela ARSLVT, IP definiu como objetivo específico, rastrear toda a população elegível (homens e mulheres entre os 50 e os 74 anos) da Península de Setúbal. O alargamento a toda a população elegível tem vindo a ser progressivo, esperando-se a participação de mais unidades das ACES. Impõe-se também um reforço da informação ao utente, de modo a aumentar o número de aderentes ao rastreio.

No que diz respeito ao teste PSOF, o método imunoquímico tem vindo a revelar maior exatidão na deteção de CCR e adenomas em fase avançada, comparativamente a outros métodos, sendo este considerado como técnica de primeira linha no rastreio do CCR.<sup>35</sup> Estes testes tendem a ser mais facilmente aceites pelos doentes, pois são não invasivos, e não requerem uma restrição na dieta. O ideal seria a colheita de mais do que uma amostra por utente, pois a hemorragia intestinal oculta pode-se apresentar como intermitente e inespecífica, no entanto as guidelines europeias de 2010 para a qualidade no diagnóstico de cancro colorretal recomendam a utilização de amostra única para o rastreio.<sup>21</sup>

Devido a avanços no campo da genética molecular, existem já disponíveis novos métodos de rastreio do CCR, como o Teste de DNA Fecal (TDF). Este método consiste na deteção de segmentos anormais de DNA nas fezes. O teste baseia-se no princípio de que as células do CCR e dos adenomas que contêm mutações do DNA, vão sendo continuamente libertadas para as fezes, tornando assim a sua deteção possível numa amostra fecal.<sup>35</sup> Não existe nenhuma mutação genética exclusiva para todas as neoplasias colorretais, sendo por isso necessário recorrer a vários marcadores moleculares. No entanto, existe já disponível no mercado alguns testes como o Cologuard® que incorporam um conjunto de marcadores de mutações localizadas em genes como o KRAS, o APC e o TP53 assegurando uma alta sensibilidade na deteção de carcinomas.<sup>36</sup>

A vantagem do método TDF consiste na deteção de mutações em células no epitélio intestinal que são continuamente libertadas, contrariamente às hemorragias provocadas pelo CCR que podem se apresentar como intermitentes, reduzindo assim a recorrência a métodos mais invasivos como a colonoscopia e a sigmoidoscopia. O Cologuard® foi o primeiro teste de DNA fecal a ser aprovado pela U. S. Food and Drug Administration como teste de rastreio do CCR.<sup>30</sup>

Alguns estudos mostram resultados promissores relativamente ao método TDF evidenciando a sua sensibilidade na deteção do CCR, comparativamente ao método TIF. As desvantagens deste método são os ainda custos elevados, e o facto de ser um teste baseado num conjunto de marcadores que identificam a maioria, mas não a totalidade dos casos de CCR.<sup>37</sup>

Alguns estudos propõem ainda outro método, como a pesquisa de microRNAs nas fezes como opção para o rastreio do CCR. MicroRNAs são pequeno segmentos de RNA que impedem a tradução

do RNA mensageiro (mRNA), resultando na degradação do mRNA e na regulação da expressão dos vários genes. Estudos recentes demonstram que uma expressão anormal dos microRNAs tem um papel fundamental no início e progressão de várias neoplasias como o CCR. Estes microRNAs podem ser encontrados nas fezes de doentes com neoplasia colorretal, o que sugere que podem ser usados como biomarcadores do CCR. No entanto, o interesse clínico destes biomarcadores ainda não é conclusivo, sendo necessário mais estudos independentes neste campo.<sup>38</sup>

Embora exista ainda alguma controvérsia no que diz respeito ao método mais efetivo e custo-eficaz, é cada vez mais consensual que, independentemente da abordagem, o rastreio de CCR apresenta vantagens incontornáveis comparativamente com o não rastreio.<sup>31</sup>

## BIBLIOGRAFIA

1. Knowles, M. A. e Selby, P. J. (2005). *Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer*. 4ª. Ed, Oxford University Press. New York.
2. Goba Burden of Disease Cancer Collaboration. *The Global Burden of Cancer 2013*. JAMA Oncol. 2015; 1:505.
3. GLOBOCAN database. *Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012*. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr>. Acesso em Setembro 2018.
4. Armesí, F., Agustín M. e Clifford, K. Y. *Colorectal Cancer: Epidemiology, Risk Factors, and Health Services*. Clin Colon Rectal Surg. 2005; 18: 133-140.
5. Chan, A. T. e Giovannucci E. L. *Primary prevention of colorectal cancer*. Gastroenterology. 2010; 138: 2029-2043.
6. Segnan, N.; Patnick J. e Von Larsa, L. (2010). *European Guidelines for Quality Assurance in Colorectal Cancer Screening and Diagnosis*. First Edition, Publications Office of the European Union. Luxembourg.
7. Siegel, R. L., Miller K. D. e Jemal A. *Cancer statistics*. CA Cancer J. Clin. 2015; 65:5-29.
8. Vicente-Dueñas, C., Romero-Camarero, I., Cobalela, C. e Sánchez-García, I. *Function of oncogenes in cancer development: a changing paradigm*. EMBO J. 2013; 32: 1502-1513.
9. Fearon, E. R. e Vogelstein, B. *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. Cell. 1990; 61: 759-67.
10. Wilson, P. M., Labonte, M. J. e Lenz H. J. *Molecular markers in the treatment of metastatic colorectal cancer*. Cancer J. 2010; 16: 262-72.
11. Macrae, F. A. e Bendell, J. *Clinical presentation, diagnosis, and staging of colorectal cancer*. 2018. [UpToDate]

12. Ferreira, A. L. M. (2014) *Marcadores Genéticos no Cancro Colorretal: Importância no Diagnóstico e Terapêutica*. Tese de Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Universidade de Coimbra, Coimbra. 31pp.
13. Markowitz, S. D. e Bertagnolli M. M. *Molecular Basis of Colorectal Cancer*. N. Engl. J. Med. 2009; 361: 2449-2460.
14. Cancer Genome Atlas Research Network. *Comprehensive Molecular Characterization of Human Colon and Rectal Cancer*. Nature. 2012; 487: 330-337.
15. Win A. K., Macinnis R.J., Hopper J. L. e Jenkins M. A. *Risk prediction models for colorectal cancer: a review*. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 2012; 21: 398-410.
16. Compton, C. *Pathology and prognostic determinants of colorectal cancer*. 2018. [UpToDate]
17. Wilson, P. M., Labonte M. J. e Lenz H. J. *Molecular markers in the treatment of metastatic colorectal cancer*. Cancer J. 2010; 16: 262-72. [PubMed]
18. Sobin L. H., Gospodarowicz M. K. e Wittekind C. (2011). *TNM Classification of Malignant Tumours*. 7th Edition, Willey-Blackwell. UICC International Union Against Cancer
19. PEREIRA, M., A. F. (2014) *Importância Clínica de novos Marcadores Moleculares no Cancro Colorretal*. Tese de Doutoramento em Ciências da Saúde, ramo de Medicina, Especialidade de Medicina Interna. Universidade de Coimbra, Coimbra. 241pp.
20. Miranda, N. e Portugal, C. (2015). *Relatório 2015 – Avaliação e Monitorização dos Rastreios Oncológicos Organizados de Base Populacional de Portugal Continental*. DGS. Lisboa
21. Segnan, N., Patnick, J. e Von Larsa, L. (2010). *European Guidelines for Quality Assurance in Colorectal Cancer Screening and Diagnosis*. First Edition, Publications Office of the European Union. Luxembourg.
22. *Recomendação do Conselho de 2 de Dezembro de 2003 sobre o Rastreio do Cancro (2003/878/CE)*. Jornal Oficial da União Europeia. Bruxelas.

23. Programa Nacional para as Doenças Oncológicas (2017). *Programa Nacional para as Doenças Oncológicas 2017*. Direção-Geral da Saúde. Lisboa.
24. Norma 003/2014. *Rastreio Oportunístico do Cancro do Colón e do Reto*. Direção-Geral da Saúde. Lisboa.
25. Kaplan, L. A. e Pesce, A. J. (1996). *Clinical Chemistry – Theory, Analysis and Correlation*. Third Edition, Mosby – Year Book, Inc. St Louis, Missouri
26. Moayyedi, P. e Achkar E. *Does fecal occult blood testing really reduce mortality? A reanalysis of systematic review data*. Am. J. Gastroenterol. 2006; 1001:380-4.
27. Gregor, T. H. *Diagnosis of large bowel cancer in the asymptomatic patient*. JAMA. 1967; 201: 943-5.
28. Allison, J. E., Tekawa, I. S., Ransom L. J. e Adrain A. L. *A comparison of fecal occult-blood tests for colorectal-cancer screening*. N. Engl. J. Med. 1996; 334: 155-159.
29. Vaz, A. D. e Takei, K. (2007). *Imunoensaios: Fundamentos e Aplicações*. 23<sup>a</sup> ed, Guanabara Googan. Rio de Janeiro.
30. Doubeni, C. *Screening for colorectal cancer: Strategies in patients at average risk*. 2018. [UpToDate]
31. Fraser, C. G., Allison, J. E., Halloran S. P., Yong G.P., Expert Working Group on Fecal Immunochemical Tests for Hemoglobin, Colorectal Cancer Screening Committee e World Endoscopy Organization. *A Proposal to Standardize Reporting Units for Fecal Immunochemical Tests for Hemoglobin*. J. Natl. Cancer Inst. 2012; 104: 810-4.
32. Chemtrue® One-Step FOB Test – Product Code 9001C (2010). Shanghai Chemtron Biotech Co., Lda
33. Burtis, C. A., Ashwod, E. R. e Bruns, D. E. (2012) *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. Fifth Edition, Elsevier Saunders. St Louis, Missouri.

34. Issa, I. A. e Nouredine, M. *Colorrectal cancer sreening: An updated review of the available options*. World J. Gastroenterol. 2017; 23: 5086-5096.
35. Ahlquist, D. A. *Multi-target stool DNA test: a new high bar for noninvasive sreening*. Dig. Dis. Sci. 2015; 60: 623-33.
36. Sweetser S. e Ahlquist D. A. *Multi-target stool DNA test: is the future here?* Curr. Gastroenterol. Rep. 2016; 18: 30.
37. Imperiale, T. F., Ransohoff, D. F., Itzkowitz, S. H., Levin T. R., Lavin, P. *et al. Multitarget stool DNA testing for colorectal-cancer sreening*. N. Engl. J. Med. 2014; 370: 1287-97.
38. Masuda, T., Hayashi, N., Kuroda, Y., Ito, S., Eguchi, H. e Mimori, K. *MicroRNAs as Biomarkers in Colorectal Cancer*. Cancers (Basel) 2017; 9: 124

**Sites Acedidos:**

1. <http://www.hgo.pt>
2. <http://globocan.iarc.fr>
3. <http://www.cancer.gov>
4. <http://eur-lex.europa.eu>
5. <http://www.dgs.pt>
6. <http://www.nghd.pt>
7. <https://biosensing.wordpress.com>
8. <https://www.biomedicinapadrao.com.br>
9. <http://www.chemtronbio.com>
10. <https://www.alphalabs.co.uk>